

PAT-NO: JP402100647A
DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 02100647 A
TITLE: PRODUCTION OF FRIED BEAN CURD
PUBN-DATE: April 12, 1990

INVENTOR-INFORMATION:

NAME
SOEDA, TAKAHIKO
NONAKA, MASAHIKO
TAKAGI, NOBUMASA
KAWAJIRI, HIDEO
KOBATA, HIROKO

ASSIGNEE-INFORMATION:

| | |
|------------------|---------|
| NAME | COUNTRY |
| AJINOMOTO CO INC | N/A |

APPL-NO: JP63253478

APPL-DATE: October 7, 1988

INT-CL (IPC): A23L001/20

US-CL-CURRENT: 426/46

ABSTRACT:

PURPOSE: To obtain a fried bean curd at a high expansion rate, readily openable between both outer coverings and having a high mechanical strength by adding a specific amount of a transglutaminase or further a coagulant to a soybean milk liquid, processing the resultant coagulated substance into a fried bean curd dough and frying the dough in an oil.

CONSTITUTION: A transglutaminase in an amount of 0.1-10u, preferably 1-5u based on 1g proteins in a soybean milk liquid or, together with a coagulant, is

added to the soybean milk liquid at ≤80°C, preferably 40-70°C
temperature and the resultant protein coagulated substance is processed into a fried bean curd dough and fried in an oil to afford a fried bean curd suitable for 'INARI- ZUSUI' (vinegared rice ball wrapped up in a bag of fried bean curd seasoned with sugar and soy sauce).

COPYRIGHT: (C)1990, JPO&Japio

⑫ 公開特許公報 (A) 平2-100647

⑮ Int. Cl. 5

A 23 L 1/20

識別記号

108 Z

庁内整理番号

7823-4B

⑯ 公開 平成2年(1990)4月12日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全11頁)

⑭ 発明の名称 油揚げの製造方法

⑫ 特願 昭63-253478

⑫ 出願 昭63(1988)10月7日

⑬ 発明者 添田 孝彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内

⑬ 発明者 野中 雅彦 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内

⑬ 発明者 高木 伸昌 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内

⑬ 発明者 川尻 秀雄 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内

⑭ 出願人 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号

⑮ 代理人 弁理士 川口義雄 外3名

最終頁に続く

明細書

ことを特徴とする油揚げの製造法。

1. 発明の名称

油揚げの製造法

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

2. 特許請求の範囲

(1) 豆乳液に80℃以下にて豆乳蛋白 1g 当りトランスクルタミナーゼ 0.1~10U を単独に又は豆乳蛋白 1g 当りトランスクルタミナーゼ 0.1~10U と凝固剤とを併用して作用させて蛋白凝固物を製造し、得られた凝固物を油揚げ生地に加工し、この生地を油揚するることを特徴とする油揚げの製造法。

(2) 蛋白含量が45重量%以上である植物蛋白に植物蛋白 1g 当りトランスクルタミナーゼ 0.1~10U 及び植物蛋白 1重量部に対し水 1.5~4.0 重量部並びに所望により食用油 0.1~1.0 重量部を添加混練して蛋白乳化物を製造し、得られた乳化物を油揚げ生地に成型加工し、この生地を油揚する

本発明は、植物蛋白にトランスクルタミナーゼを作用させる工程を含む方法により油揚げ生地を製造し、この生地を油揚して油揚げを製造する方法に関する。

(従来技術、発明が解決しようとする問題点)

油揚げの製造法に関する特許出願は数多くみられるが、なお問題点として、油揚時の膨化が少なくしかも均一に行なわれないことに起因するサイズのはらつきが大きいこと、油揚げの中心部に豆腐の芯が形成され難く、このため内材となるべき豆腐の芯としての品質が著しく劣り、イナリ寿司用として中心から裂こうとしても両外皮間が裂けにくく破けてしまいやすいこと、などがあげられる。

(問題点を解決するための手段、発明の効果)

本発明者は、上記問題を解決すべく鋭意研究の結果、植物蛋白にトランスクルタミナーゼを作用させる工程を含む方法により油揚げ生地を製造し、この生地を油揚して油揚げを製造すれば、得られる油揚げは、膨化の割合が大きくしかもサイズのばらつきも小さく、また、中心に豆腐の層を多く残すため両外皮間を容易に開くことができ、かつ機械的強度が大であって破けにくいのでイナリ各司用として優れていることを見出し、この知見に基づき本発明を完成した。

以下、本発明の方法を、その実施態様に分けて、逐次説明する。

大豆を原料とし、これより豆乳液を製造し、これに凝固剤を作用させて蛋白凝固物を製造し、この凝固物を油揚げ生地に加工し、この生地を油揚して油揚げを製造する方法は当業者に周知であつ

乳液に作用させて蛋白凝固物を得ることである。そこで、これを中心にして詳しく述べる。

本発明で使用するトランスクルタミナーゼは、特に起源を問わず、例えばモルモットの肝臓から分離したもの（以下、MT Gaseと略記することができる）、微生物が産生するもの（以下、BT Gaseと略記することができる）を挙げることができる。前者のMT Gaseは、例えば、特開昭58-14964号に記載の方法で調製することができる。後者のBT Gaseは、新規酵素であって、本発明者の一部が発明者として関与した発明（特願昭62-165067）に係るもので、その酵素特性、製造法等については別項に記載する。

凝固処理条件は、次の通りである。

- i) 豆乳液蛋白質濃度：3～10%、好ましくは4～7%，
- ii) TGase濃度：0.1～10U/g蛋白、好ましくは

て、その製造工程の概要は例えば、次のようにあらわすことができる（太田静行他著「フライ食品の理論と実際」（（株）幸吉房編著昭和51年）第260頁参照）。

（丸大豆）－水浸漬－磨碎－消泡剤及び水添加－加熱－おから除去－（豆乳液）－凝固剤添加－（蛋白凝固物）－ゆとり－箱盛－押し－箱出し－切断－油揚（二段フライ）－冷却－（製品）

本発明の第1の実施態様は、上記製造工程に準ずるものである。因みに、上記製造工程中、大豆から蛋白凝固物を得るまでの工程が大豆を原料とする豆腐の製造法に準することは、これまた当業者に周知のことである。

本発明のこの実施態様が上記製造工程と本質的に異なるところは、トランスクルタミナーゼ（以下、TGaseと略記することができる。）を、従来の凝固剤に代えて又は従来の凝固剤と共に、豆

ましくは1～5U/g蛋白、

- iii) TGaseと併用する場合の凝固剤：一般に豆腐調製に用いられるもの全て、例えば硫酸カルシウムの各種水和物、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、天然ニガリ、グルコノデルタラクトン（GDL）等の凝固剤を従来量で例えば濃度0.1～5%となるように添加使用、
- iv) 凝固温度：TGaseの作用温度を考慮して80℃以下、好ましくは40～70℃、
- v) 凝固反応の時間：1分～3時間、好ましくは5～6分。

凝固剤は、使用しなくてもよいが、TGaseと併用する方が生地成型のしやすさの点から好ましい。

TGaseの使用量は、上記のように0.1～10U/g豆乳蛋白の範囲内である。0.1U以下では

得られる油揚げは TGase を使用しない場合と差がなく、10U 以上では膨化が抑制され、得られる油揚げはかたく、クッキー様となり不適である。

TGase が MTGase のように特定物質依存性の場合は、その物質を TGase と共に存在させることはもちろんである。

なお、凝固処理時に本発明の効果を阻害しない範囲で従来豆腐の調製に使用されている乳化剤等の各種添加物を加えてよいことは勿論である。

蛋白凝固物を油揚げ生地に加工するのは、従来法でよい。

油揚は二段フライによる。第一段目は、生地を膨化させるためのもので、約 95~110 ℃で約 4~8 分保持することにより、第二段目は、膨化状態を固定するためのもので、第一段目より高温ですなわち約 170~200 ℃で約 5~8 分保持することにより行なう。

油揚げ生地とし、この生地を上記の二段フライにより油揚するものである。この混練物に食用油をも加えるのが油揚時の膨化のしやすさの点から好ましい。

植物蛋白は、その蛋白含量が 45 重量 % 以上であるものが操作性及び膨化の点から好ましい。本発明で使用できる植物蛋白としては分離大豆蛋白、濃縮大豆蛋白、抽出大豆蛋白、脱脂大豆蛋白等の大**豆系**、バイタルグルタミン等の**小麦系**などを例示することができる。

水の使用量は、植物蛋白 1 重量部に対し、1.5~4.0 重量部、好ましくは 2.5~3.5 重量部である。水の使用量がすくな過ぎると生地成型時の操作がかたすぎて困難となり、多過ぎると生地がだれて困難となる。

食用油を使用する場合は、その使用量は、植物蛋白 1 重量部に対して 0.1~1.0 重量部、好まし

第 2 の実施形態は、第 1 の実施形態における大豆を直接原料とする豆乳液の代りに全脂豆乳粉末、又は分離大豆蛋白、濃縮大豆蛋白、脱脂大豆蛋白、抽出大豆蛋白等の大豆蛋白を原料として調製される豆乳液を使用するもので、これ以外は全て第 1 の実施形態の製造工程と同じでよい。

全脂豆乳粉末から調製される豆乳液は、豆乳粉末に加水し(7~15 倍量、好ましくは 9~11 倍量)、加熱・攪拌し(2~10 分かけて 100℃ 近辺とし、そのまま 2~10 分保つ)、放冷することによって得ることができる。また、大豆タンパクから調製される豆乳液は、タンパク含量例えば 45% 以上の大豆タンパクに水、例えば植物油等の油脂、必要に応じてテンブン、及び各種乳化剤を加えて乳化、加熱することによって得ることができる。

第 3 の実施形態は、トランスグルタミナーゼを加えた、植物蛋白と水との混練物を成型加工して

くは 0.2~0.5 重量部である。使用量がすくな過ぎるとフライ物はバザサとなり、多過ぎるとフニャフニヤとなる。食用油としては、バーム油、ラード等の固体油又は大豆油、ナタネ油、コーン油、ひまわり油、オリーブ油更にはサラダ油等の液体油を用いることができる。

トランスグルタミナーゼの使用量は、植物蛋白 1 g 当り 0.1~10 U、好ましくは 1~5 U であることは、実施形態 1 に関して前述したところと同様である。

上記原料すなわち植物蛋白、水、所望による食用油、及び TGase の混練は、通常の畜肉加工食品製造工程に用いられるものでよく、サイレントカッター、ニーダーなどの混練機を用いることができる。例えば、サイレントカッターを用いる時には 1500 rpm 程度では 10~30 分、3000 rpm 程度では 7~15 分混練すれば充分である。この混練

時に、正油、グルタミン酸ソーダなどの調味料または香辛料などを、品質に影響を及ぼさない範囲内で添加することも可能である。

混練して得られた蛋白乳化物の油揚げ生地への成型加工は、次のように行なう。まず、蛋白乳化物を適当な厚さ例えば、約5mm、適当なサイズ、形状に成型する。ついで、この成型物を常温乃至60℃程度で30分乃至3時間程度坐わらせる。こうすることによって、膨化が容易となる。

このようにして成型加工して得られる油揚げ生地を油揚する。油揚は、前述の実施様例に関して説明したと同じ二段フライにより行なう。

因みに TGase を使用しないこと以外は同様の原料を用いて類似の方法で油揚げを製造する方法が特公昭58-42751号明細書に開示されているが、この方法によって得られる油揚げの品質は未だ十分とは云い難い。

れているが、動物由来のものは、安価にまた大量に入手するのが困難であり、タンパク質をゲル化するときは酵素濃度および基質濃度と共に高くする必要があり、また Ca^{2+} 依存性があるので用途が制限される。

本発明で使用できる新規トランスクルタミナーゼ (BTGase) は、微生物、例えば、ストレプトペルチシリウム属の菌により産生されるものであるが、微生物由来の TGase についての報告は現時点ではない。

本発明で使用できる微生物由来の BTGase は安価に供給され、かつ精製も容易であるので实用性が大である。また、BTGase を用いることにより、カルシウム非存在下又カルシウム存在下のいずれでも酵素 (BTGase) 濃度及び基質濃度が非常に低いところまで品質の優れたゲル化物を製造できるという利点がある。

(新規トランスクルタミナーゼ BTGase)

(1)トランスクルタミナーゼとその由来

トランスクルタミナーゼ (TGase) は、ベチド鎖内にあるグルタミン残基の α -カルボキシアミド基のアシル転移反応を触媒する酵素である。この TGase は、アシル受容体としてタンパク質中のリジン残基の ε-アミノ基が作用すると、分子内及び分子間に ε-(γ -Glu)-Lys 架橋結合が形成される。また水がアシル受容体として機能するときは、グルタミン残基が脱アミド化されグルタミン酸残基になる反応を進行させる酵素である。

TGase のこのような性質により、TGase を用いてタンパク含有溶液又はスラリーをゲル化させることができる。

TGase は、これまでモルモット肝由来のもの (MTGase) などの動物由来のものが知ら

(2)BTGase の製造

BTGase を产生する微生物は、例えば、ストレプトペルチシリウム・グリセオカルネウム (*Streptoverticillium griseocarneum*) IFO 12776、ストレプトペルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウム (*Streptoverticillium cinnamoneum sub sp. cinnamoneum*) IFO 12852、ストレプトペルチシリウム・モバラエンス (*Streptoverticillium nobaraense*) IFO 13819 等があげられる。

これら微生物を培養し、トランスクルタミナーゼを取得するための培養法及び精製法等は次の通りである。

培養形態としては、液体培養、固体培養いずれも可能であるが、工業的には深部通気攪拌培養を行なうのが有利である。又、使用する培養源としては、一般に微生物培養に用いられる炭素源、窒素

源、無機塩及びその他の微量栄養源の他、ストレプトペルチシリウム属に属する微生物の利用出来る栄養源であれば全て使用出来る。培地の炭素源としては、ブドウ糖、ショ糖、ラステーゲン、グリセリン、デキストリン、澱粉等の他、脂肪酸、油脂、有機酸などが单独で又は組合せて用いられる。窒素源としては、無機窒素源、有機窒素源のいずれも使用可能であり、無機窒素源としては硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸ソーダ、塩化アンモニウム等が挙げられる。又、有機窒素源としては大豆、米、トウモロコシ、小麦などの粉、穀、脱脂粕をはじめコーンステイーブリカ、ペプトン、肉エキス、カゼイン、アミノ酸、酵母エキス等が挙げられる。無機塩及び微量栄養素としては、リン酸、マグネシウム、カリウム、鉄、カルシウム、亜鉛等の塩類の他ビタミン、非イオン界面活性剤、消泡剤等の菌の生育や

ルろ過、吸着剤、等電点分画等の方法が使用出来る。又、これらの方法を適当に組合せる事により BTGase の精製度が上る場合は適宜組合せて行う事が出来る。これらの方法によって得られる酵素は、安定化剤として各種の塩類、鈴類、蛋白質、脂質、界面活性剤等を加え或いは加えることなく、限外ろ過濃縮、逆浸透濃縮、減圧乾燥、凍結乾燥、噴霧乾燥の方法により液状又は固体の BTGase を得ることが出来る。

BTGase の活性測定はベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシンとヒドロキシルアミンを基質として Ca^{2+} 非存在下で反応を行い、生成したヒドロキサム酸をトリクロロ酢酸存在下で鉄錯体を形成させ 525nm の吸収を測定し、ヒドロキサム酸の量を検量線より求め活性を算出する。

BTGase 活性は、特に記載しないかぎり以

BTGase の產生を促進するものであれば必要に応じて使用出来る。

培養は好気的条件で、培養温度は菌が発育し BTGase が产生する範囲であれば良く、好ましくは 25~35°C である。培養時間は、条件により異なるが、BTGase が最も产生される時間まで培養すれば良く、通常 2~4 日程度である。

BTGase は液体培養では培養液中に溶解されており、培養終了後培養液より固体分を除いた培養ろ液より採取される。

培養ろ液より BTGase を精製するには、通常酵素精製に用いられるあらゆる方法が使用出来る。

例えば、エタノール、アセトン、イソプロピルアルコール等の有機溶媒による処理、硝安、食塩等により塩析、透析、限外ろ過法、イオン交換クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、ゲ

下に記載する方法により測定した。

〈活性測定法〉

試薬 A 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.0)

0.1M ヒドロキシルアミン

0.01 M 還元型グルタチオン

0.03 M ベンジルオキシカルボニル-L-グルタミルグリシン

試薬 B 3N - 塩酸

12% - トリクロロ酢酸

5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1N - HCl に溶解)

上記溶液の 1 : 1 : 1 の混合液を試薬 B とする。

酵素液の 0.05ml に試薬 A 0.5ml を加えて混合し 37°C で 10 分間反応後、試薬 B を加えて反応停止と Fe 錯体の形成を行った後 525nm の吸光度を測定する。対照としてあらかじめ熱失活させた酵素液

を用いて同様に反応させたものの吸光度を測定し、酵素液との吸光度差を求める。別に酵素液のかわりにレーグルタミン酸アーモノヒドロキサム酸を用いて検量線を作成し、前記吸光度差より生成されたヒドロキサム酸の量を求め、1分間に1μモルのヒドロキサム酸を生成する酵素活性を1単位とした。

④ BTGase の酵素特性

上のようにして得られる精製BTGase、即ちストレプトベチシリウム・モバランスIFO 13819のトランスクルタミナーゼ(BTG-1と命名)、ストレプトベルチシリウム・グリセオカルネウムIFO 12776のトランスクルタミナーゼ(BTG-2と命名)、ストレプトベルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウムIFO 12852のトランスクルタミナーゼ(BTG-3と命名)についての酵素化学的性質は次の

で安定であり、BTG-2はpH 5~9で安定であり、BTG-3はpH 6~9で安定である。

d) 湿度安定性：

pH 7で10分間処理では、BTG-1は40℃では88%活性が残存し、50℃では74%活性が残存し、BTG-2は40℃では86%活性が残存し、50℃では56%活性が残存し、BTG-3は40℃で80%活性が残存し、50℃では53%活性が残存する。

e) 基質特異性：

各BTGaseを用い、各種合成基質とヒドロキシルアミンとの反応を調べた。いずれのBTGaseも合成基質がベンジルオキシカルボニルアスパラギニルグリシン、ベンジルオキシカルボニルグルタミン、グリシルグルタミニルグリシンの場合反応しない。しかし合成基質がベンジルオキシカルボニルグルタミニルグリシンの場合の反応性は最も高い。この時の各種合成基質濃度は

通り。

a) 至適pH：

基質としてベンジルオキシカルボニル-レーグルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、37℃、10分反応で、BTG-1の至適pHは6~7にあり、BTG-2の至適pHは6~7付近にあり、BTG-3の至適pHは6~7付近にある。

b) 至適温度：

基質としてベンジルオキシカルボニル-レーグルタミニルグリシンとヒドロキシルアミンを使用した場合、pH 6、10分反応で、BTG-1の至適温度は55℃付近であり、BTG-2の至適温度は45℃付近であり、BTG-3の至適温度は45℃付近にある。

c) pH 安定性：

37℃、10分間処理で、BTG-1はpH 5~9

5 mMとした。結果は表-1に示される。

なお、表-1中のCBZはベンジルオキシカルボニル基の略であり、Glnはグルタミル基の略であり、Glyはグリシル基の略であり、Aspはアスパラギニル基の略である。

表-1

| 基 質 | BTG-1 | BTG-2 | BTG-3 |
|---------------------|-------|-------|-------|
| CBZ-Gln-Gly | % | % | % |
| CBZ-Gln-Gly-oEt | 100 | 100 | 100 |
| CBZ-Gln-Gln-Gly | 63 | 44 | 42 |
| CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly | 38 | 39 | 35 |
| CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly | 8 | 12 | 11 |
| CBZ-Gln | 23 | 58 | 60 |
| CBZ-Asp-Gly | 0 | 0 | 0 |
| Gly-Gln-Gly | 0 | 0 | 0 |

f) 金属イオンの影響：

活性測定系に 1 mM 濃度になるように各種金属イオンを加えて影響を調べた（結果は表-2 に示される）。いずれの BTGase も Cu²⁺、Zn²⁺により活性が阻害される。

表-2

| 金属イオン | BTG-1 | BTG-2 | BTG-3 |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|
| None | % | % | % |
| CuCl ₂ | 100 | 100 | 100 |
| BaCl ₂ | 101 | 102 | 102 |
| CoCl ₂ | 101 | 99 | 105 |
| CuCl ₂ | 103 | 103 | 103 |
| FeCl ₃ | 79 | 82 | 86 |
| KCl | 96 | 99 | 105 |
| MgCl ₂ | 102 | 104 | 103 |
| MnCl ₂ | 98 | 97 | 97 |
| NaCl | 99 | 102 | 101 |
| NiCl ₂ | 102 | 100 | 101 |
| Pb(CH ₃ COO) ₂ | 97 | 97 | 100 |
| SrCl ₂ | 100 | 101 | 100 |
| ZnCl ₂ | 15 | 24 | 24 |

g) 阻害剤の影響：

各阻害剤を 1 mM になるように加え、25°C、30分放置後、活性を測定した（結果は表-3 に示される）。いずれの BTGase もバラクロロマーキュリー-安息香酸（PCMBS と略する）、N-エチルマレイミド（NEM と略する）、モノヨード酢酸により活性が阻害される。

表-3

| 阻害剤 | BTG-1 | BTG-2 | BTG-3 |
|---------|-------|-------|-------|
| None | % | % | % |
| EDTA | 100 | 100 | 100 |
| PCMBS | 102 | 98 | 99 |
| NEM | 54 | 61 | 63 |
| モノヨード酢酸 | 5 | 5 | 3 |
| モノヨード酢酸 | 64 | 50 | 67 |
| PMSF | 104 | 95 | 101 |

表-3 中 PMSF はフェニルメチルスルホニルフルオライドの略である。

h) 等電点：

アンボライン等電点電気泳動により求めたところ、BTG-1 の等電点 PI は 9 付近であり、BTG-2 の等電点 PI は 9.7 付近であり、BTG-3 の等電点 PI は 9.8 付近である。

i) 分子量：

SDS ディスク電気泳動法より求めたところ、BTG-1 の分子量は約 38,000 であり、BTG-2 の分子量は約 41,000 であり、BTG-3 の分子量は約 41,000 である。

j) MTGase との比較：

次に BTGase とモルモット肝由来のトランスクルタミナーゼ（MTGase）との性質を比較する。尚、MTGase は、特開昭 58-149645 号に記載された方法で調製した。

表-4には各酵素化学的性質の比較を、表-5には Ca^{2+} の活性に及ぼす影響を示す。表-4および表-5より明らかのように従来主として研究されているMTGaseと放線菌由來のBTGaseとには酵素化学的性質において種々の差が見られ、特に温度安定性、分子量、等電点、基質特異性に差が見られる。また、 Ca^{2+} の存在下及び非存在下においてもBTGaseは作用する点等でもMTGaseとは明らかな差がみられる。従って、BTGaseの各酵素はMTGaseとはその性質を異にするものと考えられる。

表-4

| | BTG-1 | BTG-2 | BTG-3 | MTGase |
|---------------------|---------|---------|---------|---------|
| 至適pH | 6~7 | 6~7 | 6~7 | 6 |
| pH安定性 | 5~9 | 5~9 | 6~9 | 6~7.5 |
| 至適温度 | 55°C付近 | 45°C付近 | 45°C付近 | 50~55°C |
| 温度安定性 (%) | | | | |
| 40°C残存率 | 88 | 86 | 80 | 96 |
| 50°C残存率 | 74 | 56 | 53 | 40 |
| 分子量 | 約38,000 | 約41,000 | 約41,000 | 約90,000 |
| 等電点 | 9.0 | 9.7 | 9.8 | 4.5 |
| 基質特異性 (%) | | | | |
| CBZ-Gln-Gly | 100 | 100 | 100 | 100 |
| CBZ-Gln-Gly-dEt | 63 | 44 | 42 | 122 |
| CBZ-Gln-Gln-Gly | 38 | 39 | 35 | 288 |
| CBZ-Gly-Gln-Gly-Gly | 8 | 12 | 11 | 126 |
| CBZ-Gly-Gly-Gln-Gly | 23 | 58 | 60 | 27 |

表-5

| 金属イオン | BTG-1 | BTG-2 | BTG-3 | MTGase |
|---------------------|-------|-------|-------|--------|
| None | % | % | % | % |
| 1mM CaCl_2 | 99 | 98 | 100 | 0 |
| 5mM CaCl_2 | 100 | 100 | 99 | 39 |

(4) BTGaseの製造例

a) BTG-1の製造

ストレプトペルチシリウム・モバラエンス IF O 13819を培地組成ポリベブトン 0.2%、グリコース 0.5%、リン酸二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1%からなる培地(pH 7) 200mLに接種し、30°C、48時間培養し、得られた細胞液をポリベブトン 2.0%、ラスターーゲン 2.0%、リン酸二カリウム 0.2%、硫酸マグネシウム 0.1%、酵母エキス 0.2%、消泡剤としてアデカノール(商品名、旭電化社製品) 0.05%からなる培地 20

L (pH 7)に加え30°Cで3日間培養後ろ過し、培養液 18.5 L 得た。このものの活性は、0.35U/mgである。

培養液を塩酸で pH 6.5 に調整し、予め 0.05M リン酸緩衝液 (pH 6.5) で平衡化しておいた CG-50 (商品名、オルガノ社製品) のカラムに通した。この操作でトランスクルタミナーゼは吸着された。さらに同緩衝液で不純蛋白質を洗い流した後、さらに 0.05~0.5 M の同緩衝液の濃度勾配をつくり、通液して溶出液を分画回収し、比活性の高い分画を集めめた。電導度を 10ms 以下になるように希釈後アルーセファロースのカラムに通した。この操作でトランスクルタミナーゼは吸着された。更に 0.05M リン酸緩衝液 (pH 7) で不純蛋白質を洗い流した後、0~1 M の食塩濃度勾配をつくり通液して溶出液を回収し比活性の高い画分を集めめた。UF 6000膜を使い濃縮し、0.5M の食塩を含む 0.05

Mリン酸緩衝液(pH 7)で緩衝液を用いて平衡化させた。

得られた濃縮液を同緩衝液で予め平衡化しておいたセファデックスG-75(ファルマシアファインケミカル社製)を含むカラムに通し、同緩衝液を流して溶出液を分画した。この結果活性画分は単一のピークとして溶出された。このものの比活性は、培養液に対し625倍であり、回収率は47%であった。

b) BTG-2の製造

BTG-1の場合と同様にして、ストレプトペルチシリウム・グリセオカルネウムIFO 12776を30℃で3日間培養後ろ過し、培養液19mlを得た。このものの活性は0.28U/mmolであった。

BTG-1の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素をえた。

せた。

ついで凝固物の温度を50℃に下げ、凝固物を型箱に移し、上澄(ゆ)の大部分を適当なおもしをかけて除去した。このようにして得られた豆腐の水分は86%であった。次に、豆腐をタテ40mm、ヨコ40mm、厚さ約5mmに切断し、さらに布の間にはさんで軽く押して、さらに水をとり、最終的に水分約75%の油揚げ生地とした。

このようにして調製した油揚げ生地50片をそれぞれます100℃の大豆油の中に投入し、生地が浮き上がってから5分間くらい揚げて膨化させ、ついで、180℃の油に移して約8分間処理して膨化状態を固定するとともに表面の水分を蒸散させた。このようにして50片の油揚げを製造した。

比較のために、BTGaseを使用しないこと以外は全く同様にして油揚げを製造した(対照)。

本発明の方法によって得られた油揚げは、一般

c) BTG-3の製造

BTG-1の場合と同様にして、ストレプトペルチシリウム・シナモネウム・サブ・エスピー・シナモネウムIFO 12852を30℃で3日培養後ろ過し、培養液18.5mlを得た。このものの酵素活性は0.5U/mmolであった。

BTG-1の場合と同様な方法で酵素を精製して、SDSディスク電気泳動で単一の酵素を得た。

以下、本発明を実施例により更に説明する。

実施例1

丸大豆2kgを原料とし、常法により豆乳液約20kgを得た(蛋白質濃度は約4%)。この豆乳液を100℃に加熱した後、少量の冷水を加え約70℃に冷却した。

ついで、硫酸カルシウムを45g及びBTG-1(比活性が2U/mmolのもの)を1U/g蛋白を加え、攪拌して(70℃、30分)、豆乳蛋白を凝固させた。

に、対照の油揚げに較べて、生地に対する膨化割合が有意に大きくしかもサイズのはらつきが小さく、豆腐様の芯が残り、はりがあって食感良好で、高品質のものであった。

又、硫酸カルシウムを使用せず、BTGaseのみで凝固させた場合に得らる油揚げについても上述のものと比較した。

これらの結果は表-6に示した。

表-6

| 凝固法 | 油揚げ面積(㎠) | 面積のバラツキ% | 内臓豆腐(芯) | コメント |
|------------|----------|----------|---------|-----------------------------|
| BTGase+凝固剤 | 4355 | ±3.0 | + | 表面はうすくなるが強く、破れにくい。かつ、豆腐芯多い。 |
| BTGase | 4025 | ±4.8 | + | 表面はうすいが、破れやすい。 |
| 凝固剤 | 3840 | ±5.5 | ± | 表面は厚いが、ソフトで破れやすい。又、豆腐芯少ない。 |

(*): 膨化度は面積(タテ×ヨコ)で示す。油揚げ前の生地は40×40-1600㎠である。

実施例 2

分離大豆蛋白（味の素（株）製「アジプロン-SY」、蛋白含量87%）を100g、大豆油を50g、水を350g及びBTG-1（比活性が2U/mgのもの）を90Uをサイレントカッターで1500rpmで10分間混練して蛋白乳化物を得た。

この蛋白乳化物をタテ40mm、ヨコ40mm、厚さ5mmに成型し、10℃で1時間坐らせて油揚げ生地とした。

この生地20片をそれぞれ大豆油を用いて二段フライにより油揚した。第1段目は105℃で5分、第2段目は190℃で6分であった。

比較のために、BTGaseを使用しないこと以外は全く同様にして油揚げを製造した（対照）。

本発明の方法によって得られた油揚げは、対照の油揚げに較べて、生地の膨化の割合が著しく大きく（タテ、ヨコ各2.9倍に膨化したのに対し、

BTG-1（比活性が2U/mgのもの）を92Uをとり、蛋白乳化物^を形成した後に実施例2と同様にして油揚げ生地を作成し、油揚して油揚げを製造した。

比較のために、BTGaseを使用しないこと以外は全く同様にして油揚げを製造した。

本発明の方法によるときは、油揚の際の生地の膨化が大きく（2.1倍）しかも均一であったのに對し、対照方法によるときは膨化は殆んどみられなかつた。又、本発明方法による油揚げは豆腐様の芯を有し、外観、食感とも油揚げらしかったのに対し、対照油揚げは豆腐様の芯は残っておらず、外観はクッキー様で、食感はかたくもろいものであつた。

対照の油揚げはタテ、ヨコ各2.6倍膨化したに過ぎない。）、また、BTGaseを使用したもののはサイズのはらつきが±3.5%と小さく、豆腐様の芯が残り、より油揚げらしい外観を有し、また官能検査の結果食感も良好であるとの評価を得た。

実施例 3

大豆油を使用しないこと以外は実施例2と同様にして油揚げを製造した。

この油揚げは、大豆油を使用した実施例2の油揚げと比較して、膨化は小さかったが、表面は強度が強いものであった。

また、大豆油もBTGaseも使用せずに製造した油揚げと比較して、膨化し、なめらかでのどごしが優れていた。

実施例 4

豆乳粉末（日本タンパク工業社製「ハイプロトントン」、蛋白含量46%）を200g、水を300g及び

第1頁の続き

②発明者 木幡 浩子 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号 味の素株式会社中央研究所内